

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of
Klaus Bosslet et al.

Examiner: Fetterolf, Brandon J

Group Art Unit.: 1624

Application No.: 10/815,925

Filed: April 02, 2004

Title: **BIFUNCTIONAL GLYCOPROTEINS
HAVING A MODIFIED
CARBOHYDRATE COMPLEMENT
AND THEIR USE IN TUMOR-
SELECTIVE THERAPY**

CERTIFICATE OF MAILING (37 CFR 1.8a)

I hereby certify that this paper (along with any referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the: Commissioner for Patents, P. O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Date of Deposit Sept. 5, 2007

Delia Coughlin

(Type or print name of person mailing paper)

Delia Coughlin
(Signature of person mailing paper)

Mail Stop
Commissioner for Patents
P. O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

**SUBMISSION AND REQUEST FOR ENTRY
OF PRIORITY PAPERS 37 C.F.R. § 1.55(a)**

Applicants submit herewith certified copies of German application P4314556.6, filed on May 4, 1993, for which priority is claimed in the above-identified application.

This submission and request for entry is being made to satisfy the requirements under 35 U.S.C. § 119. Please note that no fees are associated with the entry of the priority documents since they are being timely submitted prior to the date the issue fee is due.

Respectfully submitted,

Karen Krupen
Karen I. Krupen, Reg. No. 34,647
Attorney/Agent for Applicant

sanofi-aventis U.S. Inc.
U.S. Patent Operations
Route #202-206 / P.O. Box 6800
Bridgewater, New Jersey 08807-0800
Telephone (908) 231-4658
Telefax (908) 231-2626

Docket No. DEAV1993/B005 US CNT 2

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

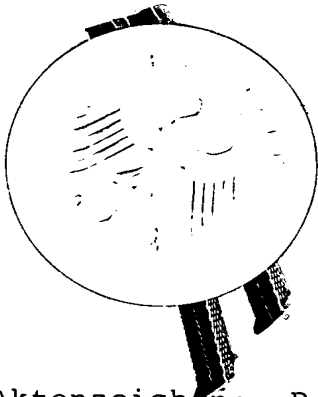
Die BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT in 3550 Marburg hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Modifizierte Antikörperenzymkonjugate und Fusionsproteine sowie ihre Anwendung zur tumorselektiven Therapie"

am 4. Mai 1993 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K 15/28, C 07 K 15/06, A 61 K 39/395 und A 61 K 37/02 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.



München, den 16. November 1993
Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the official representing the President of the DPMA.

Schäfer

Aktenzeichen: P 43 14 556.6

Modifizierte Antikörperenzymkonjugate und Fusionsproteine sowie ihre Anwendung zur tumorselektiven Therapie

Die Erfindung betrifft Fusionsproteine und Antikörperenzymkonjugate, an welche Zuckermoleküle kovalent gebunden werden (1) und/oder schon gebundene Zuckermoleküle durch An- oder Abbau von Kohlenhydratbestandteilen modifiziert werden (2). Die betroffenen Fusionsproteine und Antikörperenzymkonjugate besitzen eine an Tumoren bindende Komponente sowie eine Komponente mit enzymatischer Aktivität, durch die ein nicht-toxisches "Prodrug" in ein toxisches "Drug" gespalten wird. Die genannten modifizierten Fusionsproteine und Antikörperenzymkonjugate (1) und (2) werden durch chemische oder enzymatische Glykosilierung gewonnen, wobei die Umsetzung mit monomeren Zuckern wie Galaktose bevorzugt ist. Bei partiellem Abbau von Verbindungen (2) ist die Umsetzung mit Neuraminidase bevorzugt.

Bei der Bekämpfung von Tumoren wurden in den letzten 20 Jahren eine Reihe von Versuchen unternommen, basierend auf der Spezifität von Antikörpern selektive therapeutische Effekte zu erzielen. Bahnbrechende therapeutische Erfolge wurden bei soliden Tumoren allerdings noch nicht erzielt. Dieser fehlende Durchbruch ist, obwohl hochspezifische tumorselektive monoklonale Antikörper verfügbar sind, hauptsächlich durch die geringe Menge an in soliden Tumoren lokalisierbaren monoklonalen Antikörpermolekülen bedingt. Ursache für diese für therapeutische Zwecke kaum ausreichende Lokalisation sind u.a. im Tumor vorhandene Diffusionsbarrieren (Jain, K.R., Cancer Res. 47, 3039, 1987). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden

Konzepte entwickelt, bei denen auch mit geringeren Mengen selektiv am Tumor lokalisierter Moleküle therapeutische Effekte erzielbar sind.

Das erfolgversprechendste Prinzip besteht darin, daß im 1. Behandlungsschritt ein nicht toxisches Antikörperenzymkonjugat oder Fusionsprotein, das aus einer tumorbindenden Komponente und einem Enzym besteht (wobei das Enzym ein nicht-toxisches "Prodrug" in ein toxisches "Drug" spalten kann), i.v. in Tumorpatienten appliziert wird. Im folgenden werden diese Fusionsproteine und die Antikörperkonjugate FUP bzw. AEK genannt. Nach Eliminierung der FUP bzw. AEK aus dem Plasma und den Normalgeweben bei fortwährender Bindung am Tumor wird in einem 2. Schritt eine ebenfalls untoxische hydrophile Prodrug, die sich extrazellulär verteilt, in hoher Konzentration i.v. appliziert. Durch das am Tumor selektiv extrazellulär lokalisierte FUP oder AEK wird die Prodrug zur toxischen lipophilen Drug gespalten.

Dieses Konzept, welches die Spezifität eines monoklonalen Antikörpers bzw. tumorbindenden Fusionspartners, das katalytische Amplifikationspotential eines Enzyms und den zytotoxischen Effekt von Zytostatika nutzen möchte, ist mit einer Vielzahl technischer Schwierigkeiten behaftet.

- Herkömmliche AEK sind, da sie chemische Konjugate aus in der Regel Mausantikörpern und xenogenen Enzymen darstellen, im Menschen hoch immunogen. Eine wiederholte Anwendung des gleichen Antikörperenzymkonjugates an demselben Patienten wird hierdurch vereitelt (Bagshawe et al., 1991, Disease Markers, 9, 233-238).
- Die AEK werden nur relativ langsam aus dem Plasma ausgeschieden, so daß eine selektive und effektive Prodrugaktivierung nur nach z.B. Injektion eines galaktosylierten anti Enzym-MAk, als Halbwertszeit-verkürzendes und

Enzymaktivität-blockierendes Reagenz möglich ist (Sharma et al., Brit. J. Cancer 61, 659, 1990).

Das oben erwähnte Problem der Immunogenität xenogener Antikörperenzymkonjugate wurde in der vorliegenden Anmeldung durch die Verwendung eines rekombinanten Fusionsproteins, welches aus rein humanen Komponenten besteht, weitgehend gelöst. Einzelheiten sind in der Europäischen Patentanmeldung EP-A-0 501 215 beschrieben. Dort sind beispielhaft Fusionsproteine der allgemeinen Formel huTuMAk-L- β -Gluc beschrieben, wobei huTuMAk ein humanisierter oder humaner tumorspezifischer monoklonaler Antikörper oder ein noch an den Tumor bindender Teil davon ist, L einen Linker darstellt und β -Gluc humane β -Glucuronidase bedeutet.

Im Verlauf der pharmakologischen Prüfung eines o.g. Fusionsproteins wurde unerwarteterweise gefunden, daß schon sehr kurze Zeiträume (1-3 Minuten) nach i.v. Injektion des Fusionsproteins in humantumor-tragende Nacktmäuse signifikante Mengen des Fusionsproteins an Tumorzellen in Bereichen nahe der Blutgefäße (leicht zugängliche Stellen = "easily accessible sites" = EAS) gebunden sind. Allerdings befinden sich zu diesen frühen Zeitpunkten noch große Mengen des Fusionsproteins im Plasma, so daß eine selektive und wirkungsvolle Aktivierung einer geeigneten Prodrug im Tumor zu diesem frühen Zeitpunkt nach Injektion nicht möglich ist.

Es ist nun überraschenderweise gelungen, durch z.B. Galaktosilierung bzw. durch Abspalten endständiger Zucker, d.h. vorzugsweise Neuraminidase-Behandlung des Fusionsproteins die Halbwertszeit im Plasma so zu verkürzen, daß das so modifizierte Fusionsprotein unter Erhalt seiner Spezifität, Avidität und enzymatischen Aktivität weiterhin innerhalb kürzester Zeit an die EAS bindet und nach 1-3 Stunden soweit aus dem Plasma ausgeschieden ist, daß eine effiziente, tumor-selektive Aktivierung einer geeigneten Prodrug ohne Injektion

eines elimierenden 2. Antikörpers (Sharma et al., Brit. J. Cancer 61, 659-662, 1990) wirkungsvoll ermöglicht wird. Des weiteren ist es gelungen, durch Hinzumischen von z.B. Galaktose zu dem galaktosilierten Fusionsprotein eine noch effizientere Tumorlokalisation zu erreichen. Diese Beobachtungen konnten erfolgreich auf galaktosilierte bzw. auf mit Neuraminidase behandelte weitere Fusionsproteine und Antikörperenzymkonjugate unter Beibehaltung ihrer biologischen Eigenschaften im erfindungsgemäßen Sinne ausgedehnt werden.

Die Allgemeingültigkeit der Erfindung wurde an vier Beispielen unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung, nämlich einem xenogenen Antikörperenzymkonjugat, einem humanisierten Zweiketten-Fusionsprotein, einem humanisierten Einketten-Fusionsprotein und einem xenogenen Einketten-Fusionsprotein belegt und erstreckt sich auch auf Antikörperfragmentenzymkonjugate sowie sFv-Enzymkonjugate und Ligandenenzymkonjugate.

Ein repräsentatives Antikörperenzymkonjugat besteht aus einem intakten monoklonalen Antikörper von der Maus (z.B. MAk aus EP-A-0 388 914), welcher mittels eines heterobispezifischen Reagenzes chemisch mit der Glucuronidase aus E. coli entsprechend der Methode von Haisma et al. (Br. J. Cancer 66, 474-478, 1992) bzw. Wang et al. (Cancer Res. 52, 4484-4491, 1992) auf Proteinebene verknüpft wurde. Weitere Verknüpfungsmöglichkeiten, die ebenfalls zu funktionsfähigen Antikörperenzymkonjugaten führen können, wurden von Means und Feeney (Bioconjugate Chem. 1, 2-12, 1990) zusammengefaßt.

Ein humanisiertes Zweiketten-Fusionsprotein ist detailliert in der EP-A-0 501 215 beschrieben. Es ist ein gentechnisch hergestelltes, aus 2 Polypeptidketten bestehendes Protein. Eine Kette wurde durch Verknüpfung der Nukleotidsequenzen, die für eine humanisierte $V_{H}C_{H1}$ Hinge S Region kodieren, mit der Nukleotidsequenz, die für eine humane β -Glucuronidase kodiert, hergestellt (S = Polypeptid Spacer). Die Nukleotidsequenz, die

für die humanisierte $V_L C_L$ Kette kodiert, erzeugt zusammen mit der oben erwähnten Nukleotidsequenz nach Transfektion und Expression in geeigneten Expressionssystemen, vorzugsweise BHK oder CHO Zellen, das humanisierte Zweiketten-Fusionsprotein.

Das humanisierte Einketten-Fusionsprotein wurde durch Verknüpfung der Nukleotidsequenzen, die für die humanisierte V_H S V_L Hinge S Region (single chain Fv, sFv) kodieren, und der Nukleotidsequenz, welche für die humane β -Glucuronidase kodiert, nach Expression in geeigneten Expressionssystemen, vorzugsweise in BHK-Zellen oder CHO Zellen erzeugt. Die Konstruktion eines repräsentativen humanisierten Einketten-Fusionsproteins wird in den Beispielen 1 - 4 beschrieben. Ein xenogenes Einketten-Fusionsprotein ist in Beispiel 5 beschrieben.

Die nachstehend in den Beispielen beschriebenen Konstrukte können nach Umklonierung in geeignete Vektoren auch in anderen Expressionssystemen, wie z.B. E. coli, Saccharomyces cerevisiae und Hansenula polymorpha, Insektenzellen oder auch transgenen Tieren exprimiert werden.

Diese beispielhaft beschriebenen Proteine (Antikörperenzymkonjugat, humanisiertes Zweiketten-Fusionsprotein, humanisiertes Einketten-Fusionsprotein, xenogenes Einketten-Fusionsprotein) wurden nach der von Krantz et al. (Biochemistry 15, 3963-3968, 1976) beschriebenen Methode chemisch galaktosyliert bzw. alternativ mit trägergebundener Neuraminidase behandelt, nachdem sie über anti-Idiotyp und/oder anti- β -Glucuronidase Immunaффinitätschromatographie gereinigt wurden. Sie werden im folgenden modifizierte Proteine genannt.

Die modifizierten Proteine wurden in vitro und in vivo im Vergleich zu den unmodifizierten Ausgangsproteinen getestet. Die benutzten Spezifitäts-, Affinitäts- und quantitativen Immunreaktivitäts- und Enzymaktivitätstests zeigten, daß die

modifizierten Proteine in den oben erwähnten in vitro Tests sich nicht signifikant von den Ausgangsproteinen unterscheiden. Im Gegensatz hierzu war die Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2\beta}$) in Maus und Ratte (in vivo) bei den modifizierten Proteinen dramatisch verkürzt. Diese dramatische Verkürzung der $t_{1/2\beta}$ führte bei i.v. Injektion der galaktosylierten Proteine in tumortragenden nackten Mäusen schon nach 1-3 Stunden zu nicht mehr nachweisbaren Konzentrationen an modifizierten Proteinen im Plasma. Im Falle der desialylierten Proteine war die $t_{1/2\beta}$ derart verkürzt, daß nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbare Konzentrationen an desialyliertem Protein im Plasma nachweisbar waren. Zum gleichen Zeitpunkt lag die Konzentration funktionell aktiver modifizierter Proteine im Tumor im Bereich von 200-400 ng/g Tumor (bei Injektion von $\approx 400 \mu\text{g}$ modifiziertem Protein pro Maus ergab sich folglich ein sehr hohes Spezifitätsverhältnis $> 100:1$). Absolut gesehen können die Konzentrationen an modifizierten Proteinen um zwei- bis dreimal höher liegen als die, welche bei einem vergleichbaren Spezifitätsverhältnis mit unmodifizierten Ausgangsproteinen in vivo nach wesentlich längeren Zeiträumen erreicht werden. Weiterhin wird das oben erwähnte hohe Spezifitätsverhältnis (μg modifiziertes Protein/g Tumor : μg modifiziertes Protein/g Normalgewebe) im Falle der modifizierten Proteine schon nach wenigen Stunden erreicht (1-3 Stunden bzw. 48 Stunden), wohingegen ein vergleichbares Spezifitätsverhältnis (μg unmodifiziertes Ausgangsprotein/g Tumor : μg unmodifiziertes Ausgangsprotein/g Normalgewebe) im Falle der unmodifizierten Ausgangsproteine erst nach mehreren Tagen ($\approx 7-8$ Tage) erreicht wird oder sogar der Verwendung eines 2. Antikörpers zur beschleunigten Clearance aus Normalgewebe bedarf. Die schnelle Entfernung der modifizierten Proteine aus dem Plasma und dem extrazellulären Bereich des Organismus durch Internalisation über Zucker-bindende Rezeptoren (hauptsächlich den Galaktoserezeptor in der Leber, Thornburg et al., J. Biol. Chem. 255, 6820, 1980) sollte auch zu einer reduzierten Immunogenität der modifizierten Proteine vor allem aber des Antikörperenzymkonjugates und

des xenogenen Einketten-Fusionsproteins im Menschen führen. Dies erleichtert also auch den Einsatz von xenogenen oder humanisierten Fusionsproteinen in der Anti-Tumor-Therapie bzw. macht einen solchen Einsatz überhaupt erst sinnvoll.

Tabelle 2:

Linker-Sense:

5'

GGT GGA TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT

3'

GAC ATC CAG CTG ACC CAG AGC

VL(Mut)-For:

5'

TGC AGG ATC CAA CTG AGG AAG CAA AGT TTA AAT TCT ACT

3'

CAC CTT TGA TC

Beispiel 2:

Die Oligonukleotide Linker-Anti und Linker-Sense sind partiell komplementär zueinander und codieren einen Polypeptid-Linker, der die V_H - und V_L -Domäne zu einem sFv-Fragment verknüpfen soll. Um die amplifizierten V_H - mit den V_L -Fragmenten zu fusionieren, werden sie gereinigt und in einer 10 Zyklen Reaktion wie folgt eingesetzt:

H ₂ O:	37.5 µl
dNTPs (2.5 mM):	5.0 µl
PCR-Puffer (10x):	5.0 µl
Taq-Polymerase (Perkin-Elmer Corp., Emmeryville, CA) (2.5 U/µl):	0.5 µl
0.5 µg/µl DNA des V_L -Frag.:	1.0 µl
0.5 µg/µl DNA des V_H -Frag.:	1.0 µl

PCR-Puffer (10x): 100 mM Tris, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.1 % (w/v) Gelatine.

Die Oberfläche des Reaktionsgemisches wird mit Paraffin versiegelt und anschließend die 10 Zyklen Reaktion in einer PCR-Apparatur mit dem Programm 94° C, 1 min; 55° C, 1 min; 72° C, 2 min, durchgeführt. Danach werden 2,5 pM der flankierenden Primer pAB-Back und V_L(Mut)-For zugegeben und weitere 20 Zyklen durchgeführt. Man erhält ein PCR-Fragment, das aus dem V_H-Gen besteht, welches über einen Linker mit dem V_L-Gen verbunden ist (Fig. 4). Vor dem V_H-Gen befindet sich noch die V_H-Gen eigene Signalsequenz. Durch das Oligonukleotid V_L(Mut)-For wird gleichzeitig die letzte Nukleotidbase des V_L-Gens, ein C, gegen ein G ausgetauscht. Dieses PCR-Fragment codiert für einen humanisierten Single-Chain-Fv (sFv).

Beispiel 3:

Das sFv-Fragment aus Beispiel 2 wird mit HindIII und BamHI geschnitten und in den mit HindIII vollständig und mit BglII partiell gespaltenen Vektor pABstop 431/26V_HhuβGluc1H ligiert. Der Vektor pABstop 431/26V_HhuβGluc1H enthält ein V_H-Exon, einschließlich der V_H-eigenen Signalsequenz, gefolgt von einem CH1-Exon, dem Hinge-Exon eines humanen IgG3 C-Gens und der vollständigen cDNA der humanen β-Glucuronidase. Es wird der Plasmidklon pMCG-E1 isoliert, der den humanisierten sFv 431/26, ein Hinge-Exon und die vollständige β-Glucuronidase enthält (Fig. 3a, b). Vektor pABstop 431/26V_HhuβGluc ist in K. Bosslet et al., Br. J. Cancer (1992), 65, 234-238 beschrieben, wo auch die restlichen einzelnen Bestandteile in den dort aufgeführten Zitaten entnehmbar sind.

Beispiel 4:

Der Klon pMCG-E1 wird zusammen mit dem Plasmid pRMH 140 (Fig. 4), das ein Neomycin-Resistenzgen trägt und dem Plasmid pSV2 (Fig. 5), das ein Methotrexat-Resistenzgen trägt, in BHK Zellen transfiziert. Daraufhin wird von den BHK Zellen ein Fusionsprotein ausgeprägt, das sowohl die Antigenbindungseigenschaften des MAK BW 431/26hum als auch die enzymatische Aktivität der humanen β -Glucuronidase hat (siehe Beispiele 8 und 9).

Beispiel 5: Konstruktion eines xenogenen Einketten-Fusionsproteins

Das xenogene Einketten-Fusionsprotein wurde durch Verknüpfung der Nukleotidsequenzen, die für die humanisierten V_H S V_L Hinge S Regionen kodieren (siehe Beispiel 1 - 4 bzw. infra), und der Nukleotidsequenz, welche für die β -Glucuronidase aus *E. coli* kodiert, nach Expression in geeigneten Expressionssystemen, vorzugsweise in BHK-Zellen, erzeugt.

Die Konstruktion eines Einketten-Fusionsproteins aus einem humanisierten sFv (anti CEA) und der *E. coli* β -Glucuronidase wird im folgenden detailliert beschrieben.

Das sFv 431/26-Fragment (a) wird für eine PCR mit den Oligos pAB-Back (Tab. 1) und sFv-For (Tab. 3) als Template benutzt. Dadurch wird am 3'-Ende des neu generierten sFv 431/26-Fragmentes (b) eine BglII- und eine HindIII-Schnittstelle eingeführt.

Das PCR-Fragment wird gereinigt, mit HindIII verdaut und in einen pUC18-Vektor ligiert, der mit HindIII geschnitten und mit alkalischer Phosphatase behandelt wurde. Es wird der Plasmidklon pKB01 isoliert, der das sFv-Fragment mit der BglII-Schnittstelle enthält (Fig. 6).

Das für die E. coli- β -Glucuronidase codierende Gen wird über PCR mit den Oligos E. coli- β -Gluc-Back1 (Tab. 4) und E.coli- β -Gluc.-For (Tab. 5) aus dem Vektor pRAJ260 (Jefferson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8447, 1986) herausamplifiziert und gleichzeitig am 5' Ende mit einer BglII-Schnittstelle, am 3' Ende mit einer XbaI-Schnittstelle und zusätzlich am 5'-Ende mit einer für einen Linker codierenden Sequenz versehen. Das entstehende Fragment wird gereinigt, mit BglII/ XbaI verdaut und in den ebenfalls mit BglII/XbaI verdauten Vektor pKBO1 kloniert. Es wird der Plasmidklon pKBO2 isoliert, der den über eine Linkersequenz mit der E. coli- β -Glucuronidase verknüpften sFv 431/26 enthält (Fig. 7).

Das aus dem Vektor pKBO2 durch einen HindIII/XbaI-Verdau erhaltene sFv-E. coli- β -Gluc.-Fragment wird gereinigt und in den ebenfalls mit HindIII/XbaI geschnittenen Expressionsvektor pABstop (Zettlmeißl et al. Behring Institute Mitteilungen 82, 26-34, 1988) ligiert. Es wird der Plasmidklon pKBO3 isoliert, der den humanisierten sFV 431/26, einen Linker und die vollständige E. coli- β -Glucuronidase enthält (Fig. 8).

Tabelle 3:

sFv For:

5'

3'

TTT TTA AGC TTA GAT CTC CAC CTT GGT C

Tabelle 4:

E. coli- β .Gluc Back 1:

5'

AAA AAG ATC TCC GCG TCT GGC GGG CCA CAG TTA CGT GTA GAA

3'

ACC CCA

Tabelle 5:

E. coli- β -Gluc. For:

5'

3'

GCT TCT AGA TCA TTG TTT GCC TCC CTG

Pharmakokinetikvergleich zwischen unmodifizierten und modifizierten humanisierten Zweiketten - Fusionsproteinen in Mammantumor - Xenograft (MzSto1) tragenden CD-1 Nacktmäusen

unmodifiziertes Fusionsprotein														
unmodifiziertes Fusionsprotein														
µg Fusionsprotein /gr Tumor bzw. /gr Organ gemessen im OEAT														
Tumor	Milz	Leber	Darm	Niere	Lunge	Herz	Plasma							
0,05 Std	3	21	61,4	6,5	35,6	77,6	60,1	456,2						
1 Std	4,9	15	26,1	8,6	17,3	33,9	19,5	199,9						
1,5 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
2 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
3 Std	5,7	4,8	14,8	3,5	6,5	7,7	2,5	122						
5,5 Std	3,8	3,8	8,4	3,8	7,7	8,8	2,9	84,9						
24 Std	4,7	1	2,1	0,6	2,5	2,1	0,5	19						
48 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
168 Std	0,19	0,005	0,003	0	0	0,002	0	0						

modifiziertes Fusionsprotein														
modifiziertes Fusionsprotein														
µg galaktosyliertes Fusionsprotein /gr Tumor bzw. /gr Organ gemessen im OEAT														
Tumor	Milz	Leber	Darm	Niere	Lunge	Herz	Plasma							
0,05 Std	1,6	7,1	51,9	2,15	7,78	21,6	15,7	83,3						
1 Std	0,5	0,19	1,9	0,29	1,16	0,26	0,17	0,06						
1,5 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
2 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
3 Std	0,16	0,27	0,09	0,03	0	0,3	0	0						
5,5 Std	0,27	0,02	0,11	0,05	0,02	0,08	0	0						
24 Std	0,05	0,02	0,04	0	0	0	0	0						
48 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
168 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						

modifiziertes Fusionsprotein														
modifiziertes Fusionsprotein														
µg desialyliertes Fusionsprotein /gr Tumor bzw. /gr Organ gemessen im OEAT														
Tumor	Milz	Leber	Darm	Niere	Lunge	Herz	Plasma							
0,05 Std	1,3	14,6	38,9	10,2	20,6	49,8	24,2	234,9						
1 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
1,5 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
2 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
3 Std	3,3	1,1	2,8	0,37	1,5	1,8	1,3	13,8						
6 Std	2,9	0,1	0,22	0,02	0,04	0,19	0,06	0,65						
24 Std	0,4	0,1	0,04	0,002	0,004	0,16	0,001	0,004						
48 Std	0,1	0	0,04	0	0	0,55	0	0						
168 Std	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						

modifiziertes Fusionsprotein														
modifiziertes Fusionsprotein														
µg galaktosyliertes Fusionsprotein /gr Tumor bzw. /gr Organ gemessen im EAT														
Tumor	Milz	Leber	Darm	Niere	Lunge	Herz	Plasma							
n.d.	35,5	75,1	14	13	39	17,9	n.d.							
n.d.	27,6	167,5	17,4	5,5	7,2	1,4	n.d.							
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.							
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.							
n.d.	23,8	132,7	8,9	4,4	6,3	0,86	n.d.							
n.d.	28,3	164,5	10,7	4,1	6	1,1	n.d.							
n.d.	31,5	126,2	12,8	4,7	5,6	1,4	n.d.							
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.							
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.							

modifiziertes Fusionsprotein														
modifiziertes Fusionsprotein														
µg desialyliertes Fusionsprotein /gr Tumor bzw. /gr Organ gemessen im EAT														
Tumor	Milz	Leber	Darm	Niere	Lunge	Herz	Plasma							
1,3	43,2	63,2	48,7	23,8	56,1	25,7	250							
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.							
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.							
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.							
3,3	69,8	199,2	9,2	7,4	6,1	3,9	13,5							
2,9	68,7	342,1	10,6	4	4,1	2,5	0,76							
0,4	179	641,1	34,6	15,8	16,9	7	0,058							
0,1	185,9	639,7	32,7	8,8	21	12,7	0,013							
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.							

[illegible][illegible]

Beispiel 6: Galaktosilierung des Zweiketten-Fusionsproteins

Die Galaktosilierung des Fusionsproteins wurde gemäß einer Modifikation der Methode von Mattes (J. Natl. Cancer Inst., 79 (4), 855-863, 1987) durchgeführt:

Cyanomethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (Sigma; 250 mg) wurde in getrocknetem Methanol (Merck; 6.25 ml) gelöst und 625 μ l einer methanolischen Natriummethanolatlösung (5.4 mg/ml) zupipettiert. Nach 48 h Inkubation bei R.T. wurde ein Aliquot von 5 ml des aktivierten Galaktosederivates entnommen und im Stickstoffstrom das Methanol abgedampft. Zum verbleibenden Rückstand wurden 100 ml einer Fusionsproteinlösung (1 mg/ml in 0.25 M Natriumboratpuffer, pH 8.5) gegeben und 24 h bei R.T. inkubiert. Anschließend folgte eine Dialyse über Nacht gegen PBS.

In analoger Weise erfolgte die Galaktosilierung der präformierten BW 431/26-E. coli β -Glucuronidase Konjugate bzw. des monoklonalen Antikörpers BW 431/26.

Beispiel 7: Aufarbeitung von Organen/Tumoren zur Fusionsproteinbestimmung

Folgende sequentielle Schritte wurden durchgeführt:

- mit Fusionsprotein bzw. Antikörperenzymkonjugat behandelte Nacktmäuse (CD1), die einen subkutanen Tumor haben, werden retroorbital entblutet und dann getötet

- das Blut wird sofort in ein Eppendorfgesäß gegeben, in dem sich schon 10 µl Liquemin 25000 (Fa. Hoffman-LaRoche AG) befindet
- dann wird 10 min bei 2500 U/min in einer Zentrifuge (Megafuge 1.0, Fa. Heraeus) zentrifugiert
- danach wird das Plasma gewonnen und bis zur Testung eingefroren
- die Organe bzw. der Tumor werden entnommen und gewogen
- dann werden sie mit 2 ml 1 % BSA in PBS, pH 7.2, vollständig homogenisiert
- die Tumorphomogenate werden mit 0.1 N HCl auf pH 4.2 eingestellt (die Probe darf nicht übertitriert werden, da die β -Glucuronidase bei pH < 3.8 inaktiviert wird!)
- alle Homogenate werden 30 min bei 16000 g zentrifugiert
- der klare Überstand wird abgenommen
- die Tumorüberstände werden mit 0.1 N NaOH neutralisiert
- die Überstände und das Plasma können nun im OEAT (mißt Fusionsproteinkonzentration) oder EAT (mißt β -Glucuronidasekonzentration) getestet werden.

Beispiel 8: OEAT (Organ-Enzymaktivitätstest)

Die Testung läuft folgendermaßen ab:

- pro Loch einer Mikrotitrationsplatte (Polystyrol U-Form, Typ B, Fa. Nunc, Best.Nr. 4-60445) werden 75 µl eines 1:300 in PBS, pH 7.2, verdünnten Ziege-anti-human-kappa-Antikörpers (Fa. Southern Biotechnology Associates, Best.Nr. 2060-01) gegeben
- die Mikrotitrationsplatten werden abgedeckt und über Nacht bei R.T. inkubiert
- anschließend werden die Mikrotitrationsplatten 3mal mit 250 µl 0.05 M Tris-Citrat-Puffer, pH 7.4, pro Loch gewaschen

- diese so beschichteten Mikrotitrationsplatten werden pro Loch mit je 250 μ l Blocklösung (1 % Casein in PBS, pH 7.2) für 30' bei R.T. inkubiert (Blockierung unspezifischer Bindungsstellen)
(nicht benötigte beschichtete Mikrotitrationsplatten werden 24 Stunden bei R.T. getrocknet und dann zusammen mit Trockenpatronen zur Langzeitlagerung in beschichtete Aluminiumbeutel eingeschweißt)
- während der Blockierung wird das Substrat angesetzt (für jeden Test frisches Substrat: 2.5 mM 4-Methylumbelliferyl β -D-glucuronid, Best.Nr.: M-9130, Fa. Sigma, in 200 mM Na-Acetat + 0.01 % BSA, pH 4.5)
- danach werden in einer unbehandelten 96 Loch U-Boden Mikrotiterplatte (Polystyrol, Fa. Renner, Best. Nr. 12058) 10 Proben + 1 Positivkontrolle + 1 Negativkontrolle in 1 % Casein in PBS, pH 7.2, 1:2 in 8 Stufen ausverdünnt
(ausgehend von 150 μ l Probe werden 75 μ l Probe in 75 μ l Casein-Vorlage pipettiert usw.)
- die Blocklösung wird von der mit anti-human-kappa-Antikörper beschichteten Mikrotitrationsplatte abgesaugt, 50 μ l der verdünnten Proben werden pro Loch von der Verdünnungsplatte auf die Testplatte übertragen und 30 min bei R.T. inkubiert
- die Testplatte wird 3mal mit ELISA Waschpuffer (Behringwerke, Best.Nr. OSEW96) gewaschen
- pro Loch werden 50 μ l Substrat aufgetragen, die Testplatten abgedeckt und 2 h bei 37° C inkubiert
- danach wird zu jedem Loch 150 μ l Stopplösung (0.2 M Glycin + 0.2 % SDS, pH 11.7) hinzugegeben
- die fluorometrische Auswertung erfolgt im Fluoroscanner II (ICN-Biomedicals, Kat.Nr. 78-611-00) bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Austrahlungswellenlänge von 460 nm
- anhand der Fluoreszenzwerte der im identischen Experiment mitgeführten Positivkontrolle (Verdünnungsreihe mit gereinigtem Fusionsprotein als Eichkurve) wird die

unbekannte Konzentration von Fusionsprotein in der Probe bestimmt.

Beispiel 9: EAT (Enzymaktivitätstest)

Der Test wird folgendermaßen durchgeführt:

- In einer 96 Loch Mikrotestplatte (Polystyrol, Fa. Renner, Best.Nr. 12058) werden 10 Proben + 1 Positivkontrolle + 1 Negativkontrolle 1:2 in 8 Verdünnungsstufen in 1 % Casein in PBS, pH 7.2, ausverdünnt, so daß in jedem Loch 50 µl Proben enthalten sind
- zu jedem Loch werden 50 µl Substrat (2.5 mM 4-Methylumbelliferyl β-D-glucuronid (Fa. Sigma, Best. Nr. M-9130, in 200 mM Na-Acetat + 0.01 % BSA, pH 4.5) gegeben
- die Mikrotestplatte wird abgedeckt und 2 h bei 37° C inkubiert
- danach werden 150 µl Stopplösung (0.2 M Glycin + 0.2 % SDS, pH 11.7) pro Loch hinzugegeben
- die fluorometrische Auswertung erfolgt im Fluoroscan II (ICN-Biomedicals, Kat.Nr. 78-611-00) bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Ausstrahlungswellenlänge von 460 nm
- anhand der mitgeführten Positivkontrolle (Verdünnungsreihe mit gereinigtem Fusionsprotein als Eichkurve) kann nun die Probenkonzentration berechnet werden

Beispiel 10: Desialylierung des Zweiketten-Fusionsproteins

Die Desialylierung des Zweiketten-Fusionsproteins erfolgte analog zu Murray, G.J. (Methods in Enzymology 149, 25-42, 1987). 8 Units an Agarose gekoppelte Neuraminidase (Sigma, Typ

X-A von *Clostridium perfringens*) wurde 3x mit 40 ml 100 mM Natriumacetatpuffer, pH 5, gewaschen und als 1:1 Suspension aufgenommen. Zu dieser Suspension wurden 100 ml Zweiketten-Fusionsprotein (1 mg/ml in Natriumacetatpuffer, pH 5) gegeben und 4 h bei 37° C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die immobilisierte Neuraminidase wurde durch Abzentrifugieren entfernt und das Fusionsprotein über Nacht gegen PBS dialysiert.

**Beispiel 11: Nachweis der schnellen Eliminierung von
modifiziertem Fusionsprotein**

100 mg humanisiertes Zweiketten-Fusionsprotein wurde, wie in EP-A-0 501 215, Seite 10-11 beschrieben, aus BHK-Transfektom-Überständen gereinigt. Das gereinigte Fusionsprotein wurde, wie in den vorausgehenden Beispielen beschrieben, galaktosyliert bzw. desialyliert.

Von dem so erhaltenen modifizierten Protein, hier dem galaktosylierten humanisierten Zweiketten-Fusionsprotein, wurden 400 µg i.v. in nackte Mäuse injiziert, die 10 Tage zuvor mit je 10^6 CEA-exprimierenden humanen Magenkarzinomzellen (Mz-Sto-1) s.c. bestückt wurden. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden die Experimentaltiere getötet und die Konzentration an funktionell aktivem modifiziertem Protein im Tumor, Plasma und den Normalgeweben mittels des OEAT bzw. des EAT (siehe Beispiele 7, 8, 9) bestimmt.

Als Antigenkontrolle wurden mit je 1×10^6 CEA-negativen humanen Tumoren (Oat-75) bestückte nackte Mäuse verwendet. Des weiteren wurden als Proteinkontrolle identische Mengen des humanisierten Zweiketten-Fusionsproteins (Ausgangsprotein) bzw. einer mit Festphasenneuraminidase behandelten humanisierten Zweiketten-Fusionsproteinprobe (desialyliertes Protein) i.v. injiziert (siehe Beispiel 10). Die Mengen der in diesem repräsentativen Experiment in den Organen gefundenen

funktionell aktiven Proteine sind in Tab. 6 und Tab. 7 angegeben.

Vergleichbare Ergebnisse wurden im identischen Tiermodellsystem am Beispiel eines CEA-positiven Kolonkarzinoms, am Beispiel eines CEA-positiven Rektumkarzinoms, am Beispiel eines CEA-positiven Adenokarzinoms der Lunge, am Beispiel eines CEA-positiven Pankreaskarzinoms, am Beispiel eines CEA-positiven Schilddrüsenkarzinoms, am Beispiel eines CEA-positiven Mammakarzinoms gefunden.

Unter Verwendung geeigneter untoxischer Prodrugs, z.B. den in EP-A-0 511 917 beschriebenen, die zu einem Zeitpunkt appliziert werden, zu dem die modifizierten Proteine weitgehend aus dem Plasma eliminiert sind bzw. in den Normalgeweben internalisiert und degradiert sind, lassen sich gegenüber der Standardchemotherapie überlegene therapeutische Effekte erzielen. Diese Effekte können durch Zugabe großer Mengen von Galaktose zum jeweiligen modifizierten Protein, was zu einer Optimierung der Pharmakokinetik führt, noch verbessert werden.

Weitere Verbesserungen lassen sich durch Zugabe oder Vorinjektion von Glukose, Phosphationen oder Metaiodobenzylguanidin zum bzw. vor dem jeweiligen modifizierten Protein nach der von Jähde et al. (Cancer Res. 52, 6209-6215, 1992) beschriebenen Methode erreichen. Diese Methode führt zu einer Absenkung des pH-Wertes im Tumor. Hieraus resultiert eine effizientere Katalyse der Prodrugs durch die in den erfindungsgemäßen modifizierten und nicht modifizierten Proteinen verwendeten Enzyme. Alternativ kann zur Absenkung des pH-Wertes im Tumor auch HCO_3^- eingesetzt werden (Gullino et al., J. Nat. Cancer Inst. 34, 857, 1965).

Legende zu Fig. 1

Mit den Oligonukleotiden pAB-Back und Linker-Anti (Tab. 1) wird aus pABstop 431/26 hum VH das VH-Gen einschließlich der VH-Gen eigenen Signalsequenz herausamplifiziert (Güssow und Seemann, 1991, Meth. Enzymology, 203, 99-121). Mit den Oligonukleotiden Linker-Sense und VL(Mut)-For (Tab. 2) wird aus pABstop 431/26 hum VL das VL-Gen herausamplifiziert.

Legende zu Fig. 6

Das sFv 431/26-Fragment (a) wird für eine PCR mit den Oligos pAB-Back (Tab. 2) und sFv-For (Tab. 5) als Template benutzt. Dadurch wird am 3'-Ende des neu generierten sFv 431/26-Fragmentes (b) eine BgIII- und eine HindIII-Schnittstelle eingeführt.

Das PCR-Fragment wird gereinigt, mit HindIII verdaut und in einen pUC18-Vektor ligiert, der mit HindIII geschnitten und mit Alkalischer-Phosphatase behandelt wurde. Es wird der Plasmidklon pKB01 isoliert, der das sFv-Fragment mit der BgIII-Schnittstelle enthält.

Legende zu Fig. 7

Das für die E.coli- β -Glucuronidase codierende Gen wird über PCR mit den Oligos E.coli- β -Gluc-Back1 (Tab. 6) und E.coli- β -Gluc.-For (Tab. 7) aus dem Vektor pRAJ275 herausamplifiziert und gleichzeitig mit einer BgIII-Schnittstelle, einer XbaI-Schnittstelle und am 5'-Ende mit einer für einen Linker codierenden Sequenz versehen. Das entstehende Fragment wird gereinigt, mit GbIII/HindIII verdaut und in den ebenfalls mit BgIII-HindIII verdauten Vektor pKB01 kloniert. Es wird der Plasmidklon pKB02 isoliert, der den über eine Linkersequenz mit der E.coli- β -Glucuronidase verknüpften sFv 431/26 enthält.

Legende zu Fig. 8

Das aus dem Vektor pKB02 durch einen HindIII-XbaI-Verdau erhaltene sFv-E.coli- β -Gluc.-Fragment wird gereinigt und in den ebenfalls mit HindIII/XbaI geschnittenen Expressionsvektor pABstop ligiert. Es wird der Plasmidklon pKB03 isoliert, der den humanisierten sFv 431/26, einen Linker und die vollständige E.coli- β -Glucuronidase enthält.

Patentansprüche

HOE 93/B 005 - Ma 977

Dr. Lp./Wr.

1. Fusionsprotein oder Antikörperenzymkonjugat mit der Eigenschaft "Prodrug" in "Drug" zu spalten sowie an Tumore zu binden, dessen Kohlenhydratgehalt chemisch oder enzymatisch modifiziert ist.
2. Fusionsprotein oder Antikörperenzymkonjugat nach Anspruch 1, das chemisch oder enzymatisch glykosidiert ist.
3. Fusionsprotein oder Antikörperenzymkonjugat nach Anspruch 2, das galaktosiliert oder mannosiliert ist.
4. Fusionsprotein oder Antikörperenzymkonjugat nach Anspruch 1, dessen Kohlenhydrate chemisch oder enzymatisch teilweise abgebaut sind.
5. Fusionsprotein oder Antikörperenzymkonjugat nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es mit Endo- oder Exoglycosidasen oder Neuraminidasen behandelt wurde.
6. Fusionsprotein oder Antikörperenzymkonjugat nach Anspruch 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Eigenschaft "Prodrug" in "Drug" zu spalten durch ein Enzym humanen oder nicht humanen Ursprungs oder einen katalytischen Antikörper vermittelt wird.
7. Fusionsprotein oder Antikörperenzymkonjugat nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Penicillin-G-amidase, eine Penicillin-V-amidase, eine β -Lactamase, eine alkalische Phosphatase, eine Carboxypeptidase G2, eine Carboxypeptidase A, eine Cytosindeaminase, eine Nitroreduktase, eine Diaphorase, eine Arylsulfatase, eine

Glycosidase, eine β -Glucosidase oder eine β -Glucuronidase ist.

8. Fusionsprotein oder Antikörperenzymkonjugat nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß der tumorbindende Teil ein monoklonaler Antikörper oder Fragment davon ist, der ein Epitop auf tumorassoziierten Antigenen wie CEA, N-CAM, N-cadherin, PEM, GICA, TAG-72, TF β , GM3, GD3, GM2, GD2, GT3, HMWMAA, pMell17, gp113 (Muc18), p53, p97, MAGE-1, gp105, erbB2, EGF-, Transferrin-R, P-glykoprotein oder einem Zytokeratin erkennt.
9. Fusionsprotein oder Antikörperenzymkonjugat nach Anspruch 6, 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der monoklonale Antikörper der MAK BW 431/26 ist.
10. Fusionsproteine nach Anspruch 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein das in EP-A-0 501 215 beschriebene Protein ist.
11. Arzneimittel, enthaltend ein Fusionsprotein oder Antikörperenzymkonjugat noch einen oder mehreren der Ansprüche 1 - 10.
12. Kombinationspräparat, enthaltend ein Arzneimittel nach Anspruch 10 sowie davon getrennte Agentien zur Absenkung des pH-Werts in einem zu behandelnden Tumor und/oder applizierbare Galactose.

Fig. 1

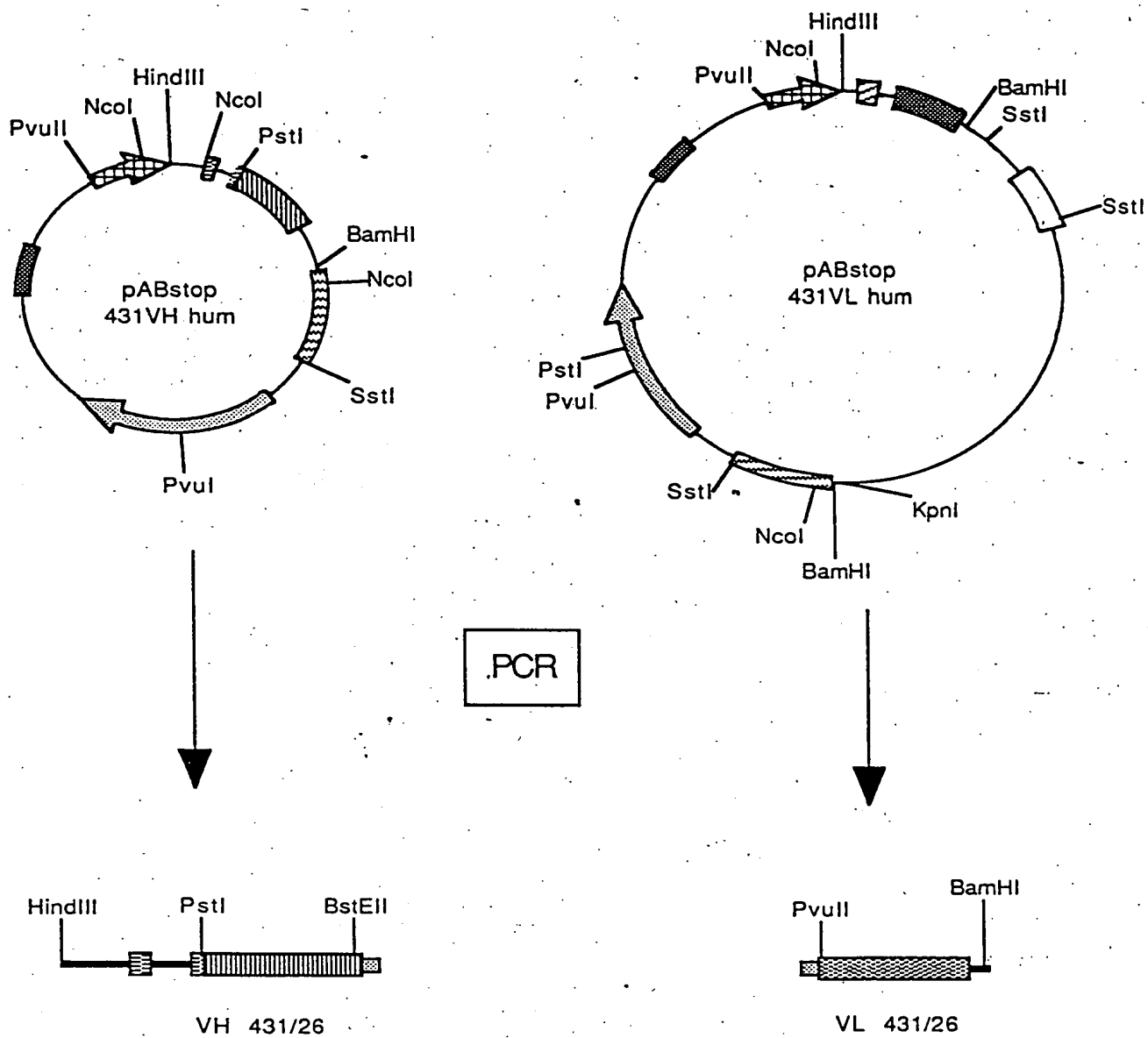


Fig. 2

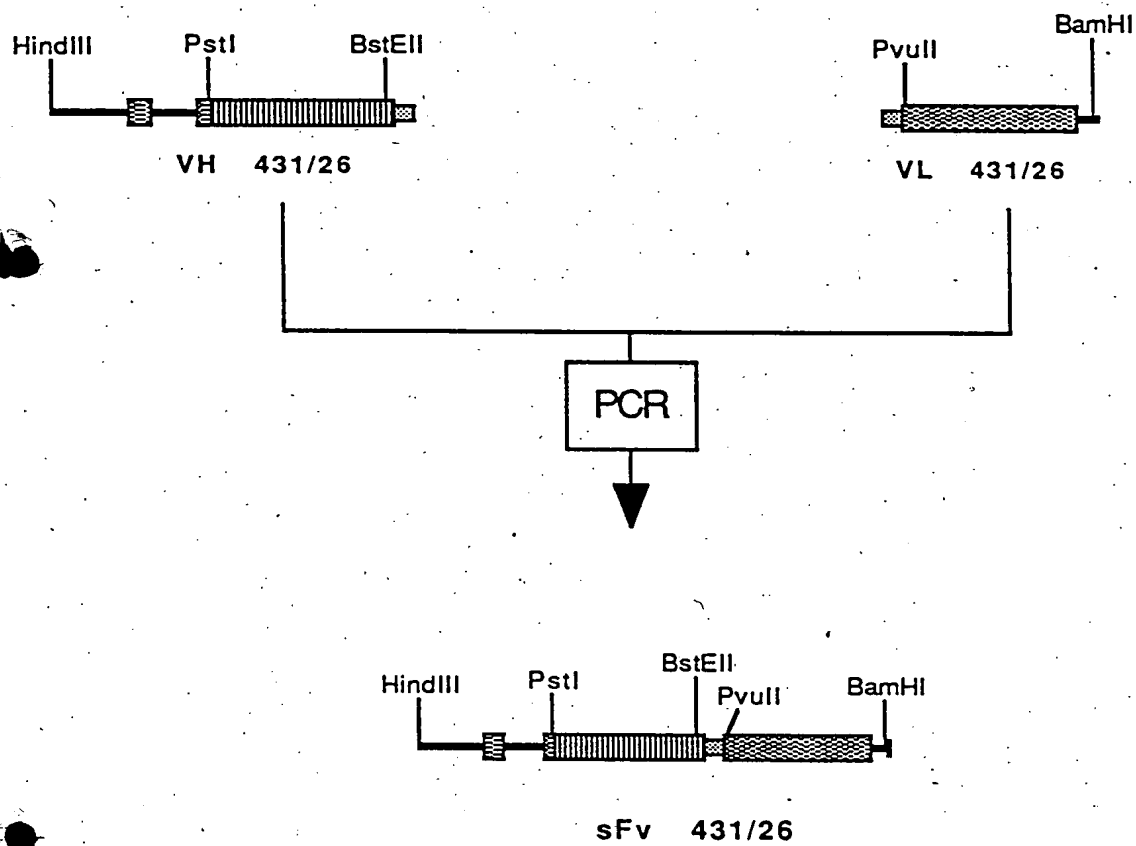


Fig. 3a

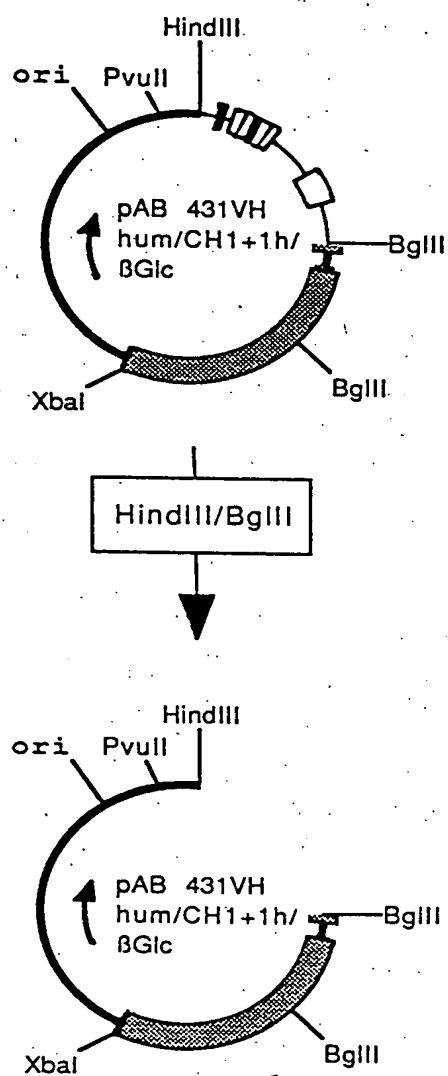


Fig. 3b

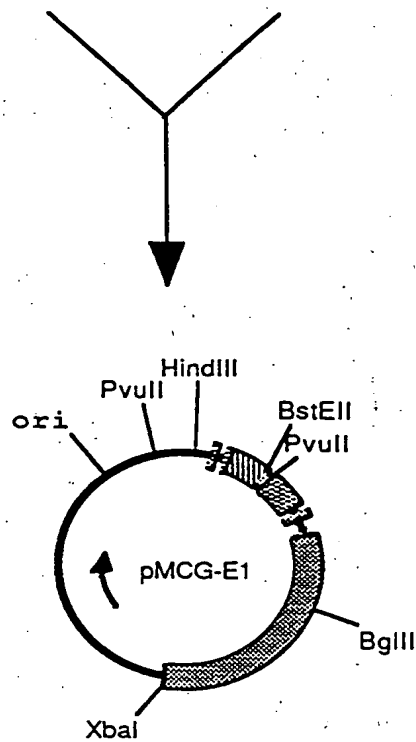
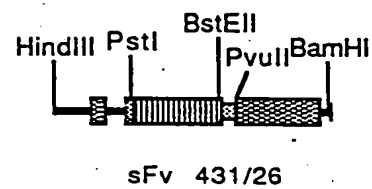
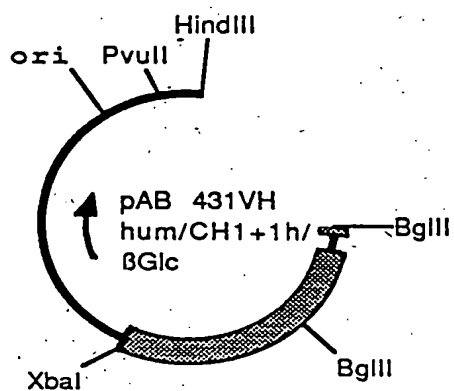


Fig.: 4

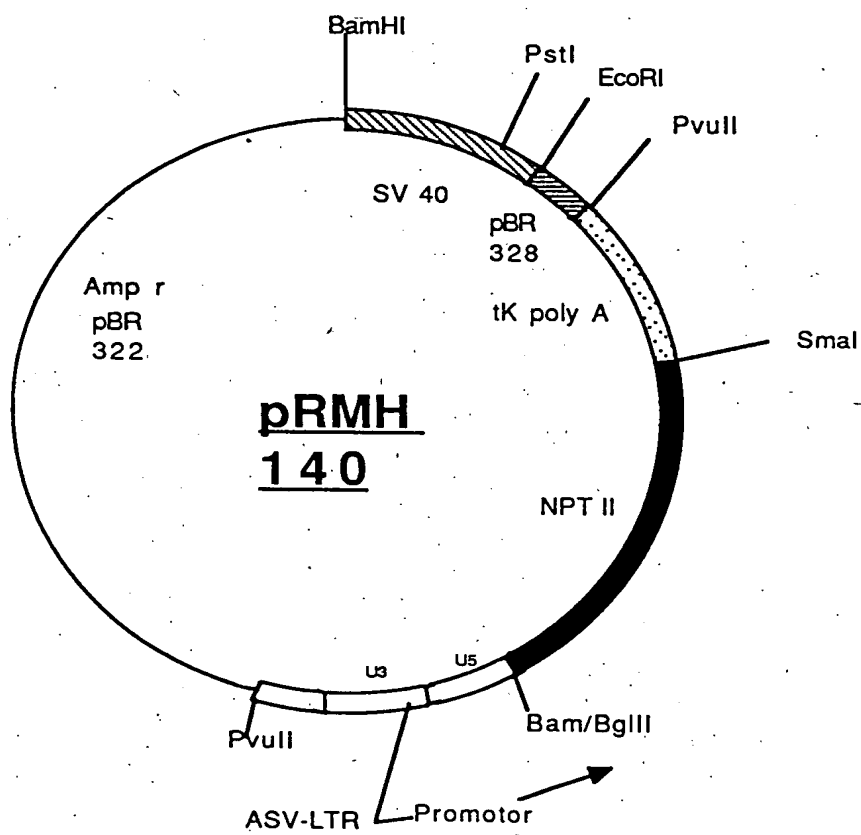


Fig.: 5

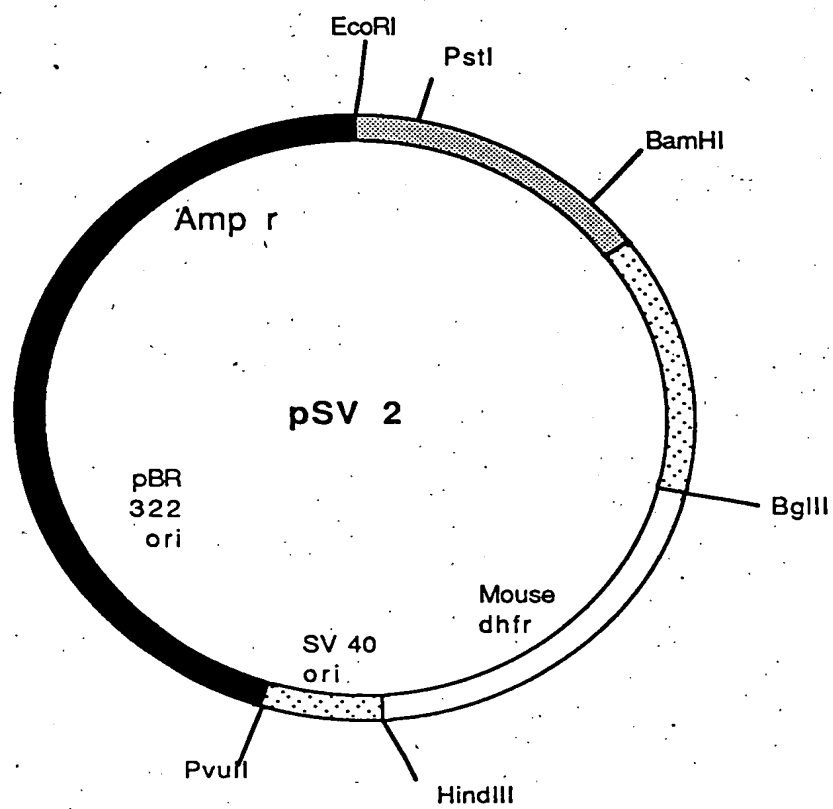


Fig. 6

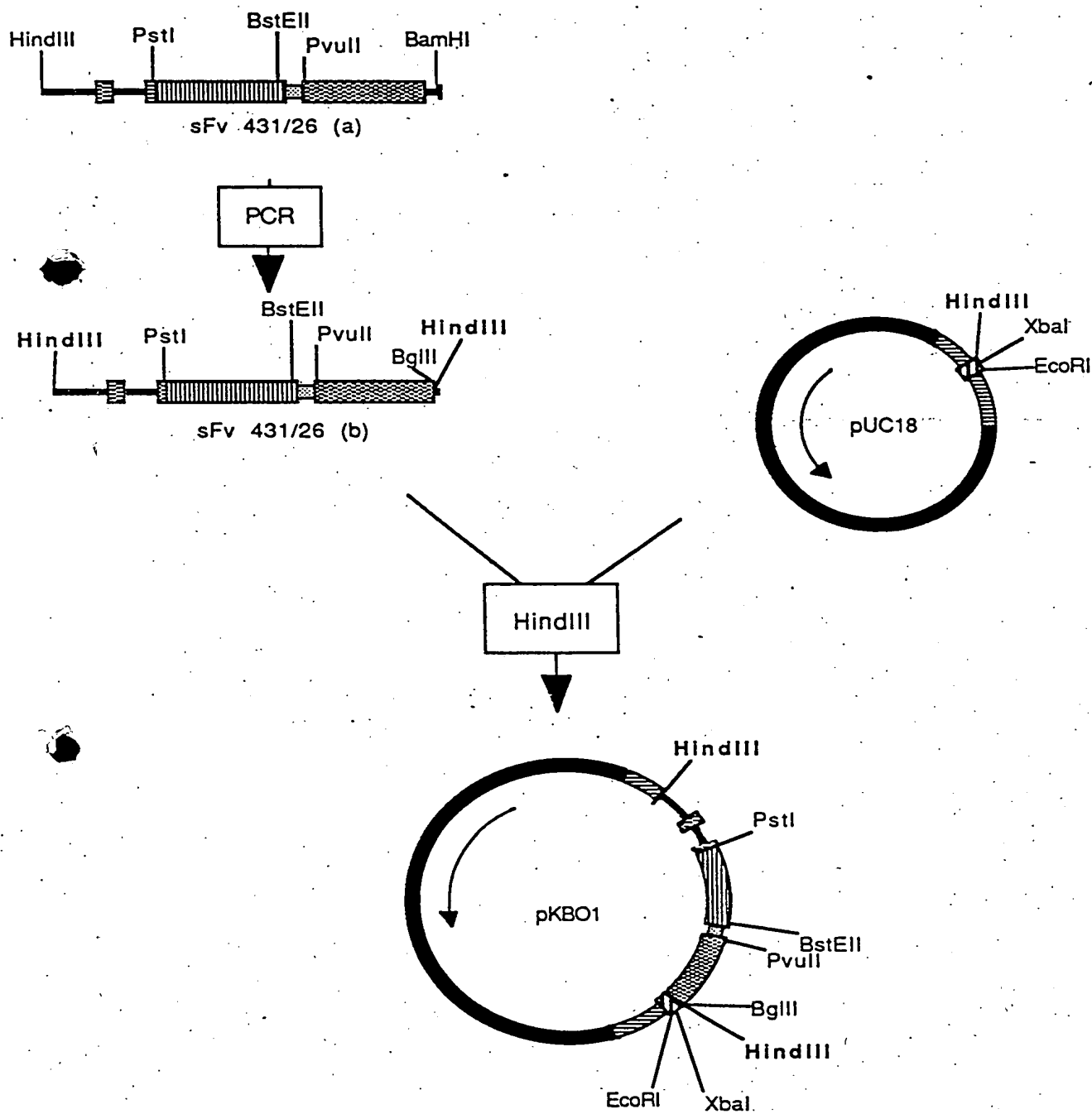


Fig. 7

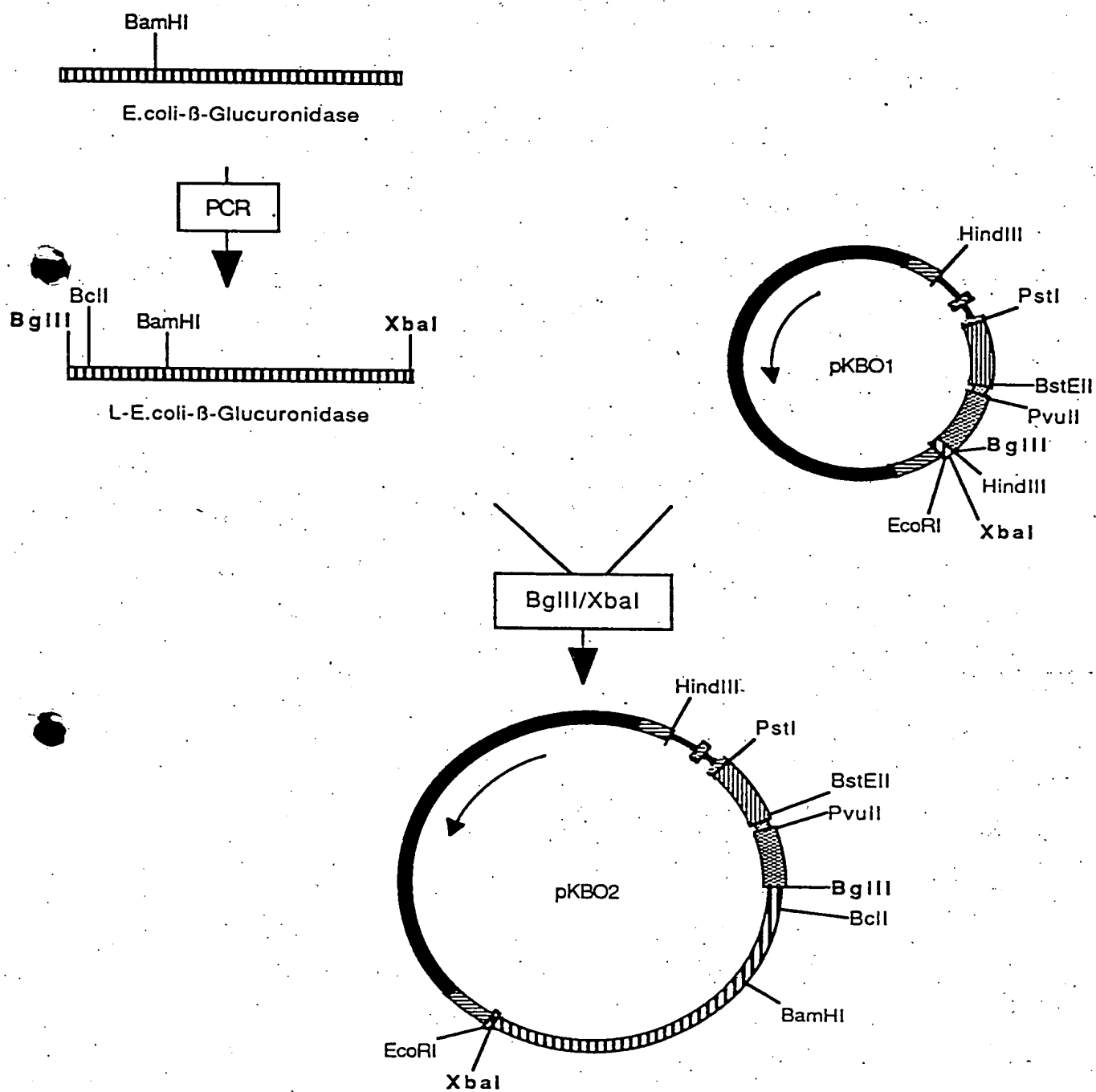
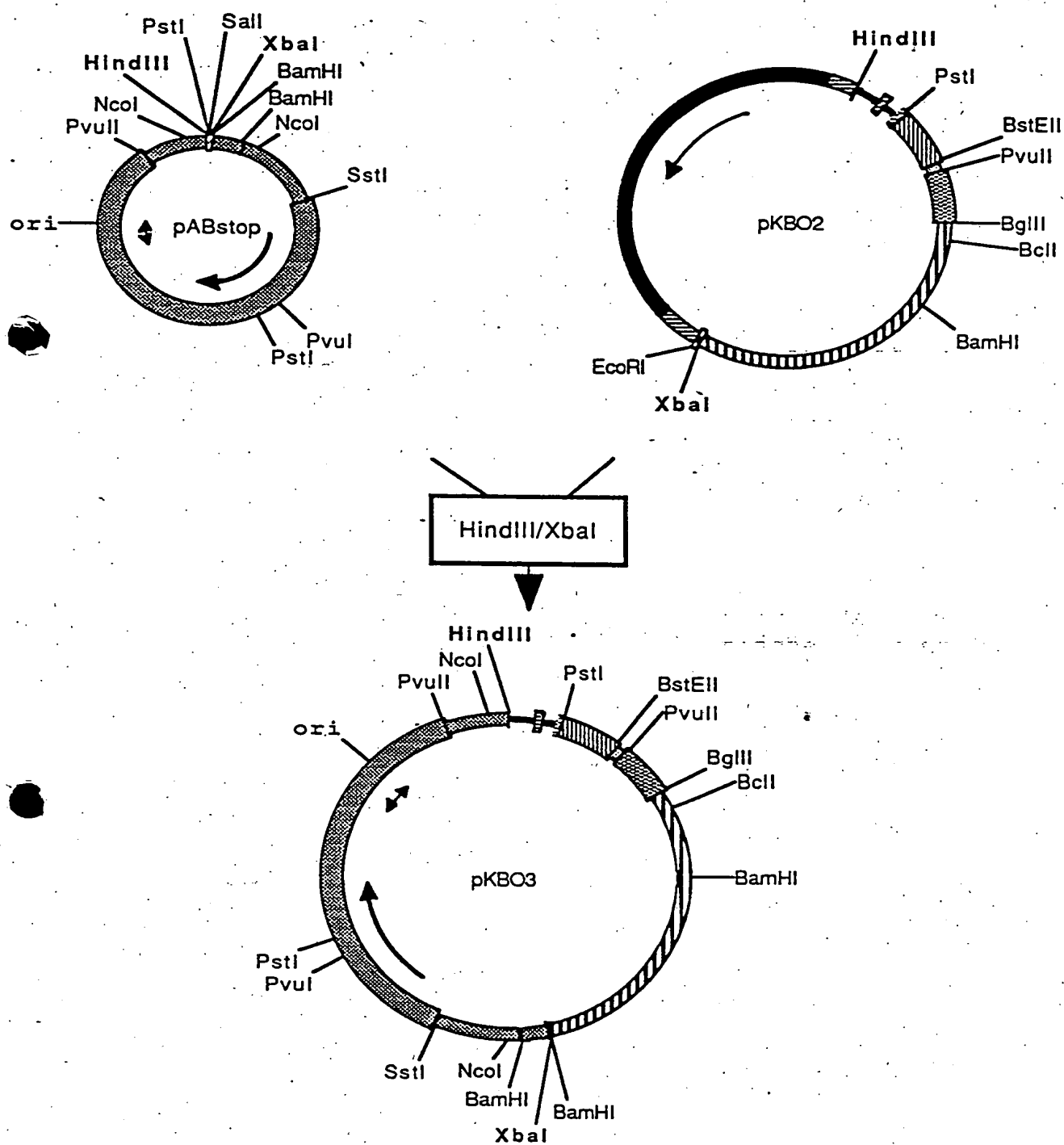


Fig. 8



**Modifizierte Antikörperenzymkonjugate und Fusionsproteine
sowie ihre Anwendung zur tumorselektiven Therapie**

Die Erfindung betrifft Fusionsproteine und Antikörperenzymkonjugate, an welche Zuckermoleküle kovalent gebunden werden (1) und/oder schon gebundene Zuckermoleküle durch An- oder Abbau von Kohlenhydratbestandteilen modifiziert werden (2). Die betroffenen Fusionsproteine und Antikörperenzymkonjugate besitzen eine an Tumoren bindende Komponente sowie eine Komponente mit enzymatischer Aktivität, durch die ein nicht-toxisches "Prodrug" in ein toxisches "Drug" gespalten wird. Die genannten modifizierten Fusionsproteine und Antikörperenzymkonjugate (1) und (2) werden durch chemische oder enzymatische Glykosilierung gewonnen, wobei die Umsetzung mit monomeren Zuckern wie Galaktose bevorzugt ist. Bei partiellem Abbau von Verbindungen (2) ist die Umsetzung mit Neuraminidase bevorzugt.